

## Príloha č. 5

### Netechnické zhrnutie projektu

**Názov projektu:** Vplyv experimentálne vyvolanej pľúcnej fibrózy na extrapulmonálne orgány (pilotná štúdia)

**Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:** 1068/19-22/3

**Kľúčové slová v projekte (max. 5 slov):** poškodenie pľúc, pľúcna fibróza, zápal, kardiomyopatia, hepatopatia

**Účel projektu:** Základný výskum s cieľom zabránenia, prevencie, diagnostiky alebo liečby chorôb, poškodenia zdravia alebo iných neprirodzených stavov človeka alebo zvierat alebo ich účinkov na ľudí alebo zvieratá.

#### **Informácie o cieľoch projektu:**

Cieľom projektu je overiť hypotézu, že primárne poškodenie pľúc môže viesť aj k nežiaducim účinkom na činnosť extrapulmonálnych orgánov (srdca, pečene, obličiek ai.), čo môže výrazne zhoršiť prognózu pacientov. Cieľom predloženého projektu (pilotnej štúdie) je zhodnotiť mieru predpokladaného sekundárneho poškodenia pečene a srdca pri primárnom chronickom poškodení pľúc, pľúcnej fibróze. Animálny model pľúcnej fibrózy vyvoláme transorálnym intratracheálnym podaním bleomycínu dospelým potkanom a v intervaloch stanovených podľa protokolu určíme zmeny na pľúcnom tkanive, ale aj na tkanive pečene, obličiek a srdca ako aj v krvnej plazme a porovnáme tieto zmeny s nálezmi u zdravých zvierat.

#### **Predpokladaný vlastný prínos projektu:**

Závažné poškodenie pľúc môže spôsobiť zápalové, apoptotické a nekrotické zmeny extra-pulmonálnych orgánov a tiež poruchu ich funkcie. Pri poškodení pľúc, ktoré môže byť samo osebe kritickým stavom, môže kardiálna, hepatálna alebo renálna insuficiencia predstavovať faktor bezprostredne ohrozujúci život. Projekt prinesie nové informácie o zmenách zápalových, pro-fibrotických, oxidačných a apoptotických markerov v pľúcnom tkanive, ale aj v tkanive srdca, obličiek a pečene v modeli pľúcnej fibrózy. V prípade potvrdenia hypotézy o negatívnom ovplyvnení extra-pulmonálnych orgánov pri tomto type poškodenia pľúc by výsledky projektu mohli predstavovať predklinickú bázu pre prípadné doplnenie protokolu liečby o kardio-, reno- a hepatoprotektíva, prípadne iné liečivá a postupy, ktoré by mohli zmierniť negatívny dopad na tieto orgány.

#### **Počet a druh zvierat:**

Potkan laboratórny (*Rattus norvegicus*, kmeň Wistar), samec, 64 jedincov

#### **Predpokladaná ujma na zvieratách:**

Model „pľúcnej fibrózy“: v celkovej inhalačnej anestéze (4% izofluran + O<sub>2</sub>) zviera umiestnime na naklonenú chirurgickú podložku, hrudník pod prednými končatinami a chvost zafixujeme k podložke adhezívnymi páskami. Transorálne pomocou pipety s

## PRÍLOHA 2

### Netechnické zhrnutie projektu

**Názov projektu:** Temozolomid v kombinácii s vybranými prírodnými látkami v liečbe glioblastómov

**Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:** 22/19/19-221/3

**Kľúčové slová v projekte ( max 5 slov):** glioblastóm, temozolomid, prírodné látky, laboratórne potkany

**Účel projektu:** Základný výskum

#### Ciele projektu:

V Európe dosahuje incidencia primárnych nádorov centrálneho nervového systému od 4,5 do 11,2 prípadov na 100 000 mužov a od 1,6 do 8,5 prípadov na 100 000 žien. Glioblastómy (GBM) tvoria asi 65% všetkých primárnych nádorov mozgu a sú charakterizované nízkou mierou prežívania. Len 10% pacientov preživa 5 rokov. Zlatým štandardom v liekovej terapii je temozolomid. Tento liek však vo vysokej miere spôsobuje rezistenciu, čím znemožňuje samotnú liečbu pacientov. Cieľom predkladaného projektu je sledovať potenciálny protinádorový vplyv vybraných prírodných látok samostatne a v kombinácii s temozolomidom v chemicky indukovanom ako aj inokulovanom modeli GBM, ako aj sledovať schopnosť týchto prírodných látok eliminovať rezistenciu na temozolomid. Okrem toho je cieľom sledovať agresivitu, lokalizáciu a veľkosť nádorov potkanov s chemicky indukovanou rakovinou mozgu a s inokulovanou GBM bunkovou líniou, ako aj mieru syntézy proteínov MGMT, MDM2, a vybraných ABC transportérov, po podaní temozolomidu v kombinácii s vybranými prírodnými látkami. **Kombinovaná chemoprevenia syntetických látok s prírodnými je sľubnou stratégiou v boji proti nádorovým ochoreniam, pretože umožňuje využitie nižších a tým častokrát aj menej toxických dávok syntetických liečiv, s možným synergickým účinkom a eliminovaním chemorezistencie.**

#### Prínos z vykonaného projektu

Prínosy riešenia predkladaného projektu predpokladáme tak v teoretickej, ako aj praktickej rovine. V súčasnosti ani jeden z používaných postupov pri liečbe GBM nie je dostatočne účinný. Považujeme preto za potrebné nachádzať neustále nové látky s protinádorovým účinkom, ktoré by boli schopné eliminovať rezistenciu buniek na štandardnú liečbu temozolomidom. Navrhovaný projekt umožní sledovať protinádorový účinok vybraných prírodných látok v kombinácii s temozolomidom *in vivo* priamo v nádorovom tkanive GBM. V rámci experimentov *in vivo* sa okrem protinádorovej aktivity látok zameriame sa aj na vyhodnotenie ich farmakokinetiky v krvi zvierat. Budeme monitorovať aj vedľajšie účinky temozolomidu (napr. trombocytopenia), prípadne ich elimináciu po kombinovanej liečbe s prírodnými látkami.

**Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:**

Potkan laboratórny, kmeň Fischer F344, parentálna generácia samce (10ks) a samice (30ks)

Potkan laboratórny, kmeň Fischer F344, F1 generácia samce (130ks) a samice (130ks)

Potkan laboratórny, kmeň Wistar, samce (230ks)

### **Predpokladaný nepriaznivý vplyv/ujma na použité zvieratá v rámci vykonávania projektu:**

V rámci projektu indukujeme zvieratám karcinogézu, ktorá môže vyvolať u zvierat nepriaznivú ujmu v podobe mierneho stresu, resp. krátkodobej miernej bolesti. Zvieratá budú pri injikovaní pociťovať krátkodobú slabú bolesť, prípadne prechodné nepohodlie po podaní injekcie. Vystavenie zvierat behaviorálnym testom tiež predstavuje istý diskomfort a prechodné nepohodlie a tieto postupy z hľadiska krutosti hodnotíme ako slabé. V prípade neočakávaného zhoršenia zdravotného stavu zvierat počas experimentu rozhodne vedúci projektu o jeho usmrtení. Zvieratám sa počas pokusu nebudú podávať látky na zníženie bolesti, pretože by tieto mohli ovplyvniť sledované parametre nádorového a metabolického procesu.

### **Predpokladaná úroveň krutosti:**

<b>Manipulácia</b>	<b>Stupeň krutosti</b>
Váženie zvierat	Slabá
Uspávanie zvierat anestetikom	Slabá
Chemická indukcia GBM	Stredne krutá
Intrakraniálna indukcia GBM bunkovou líniou C6	Stredne krutá
Navodená karcinogéza	Stredne krutá
Prežívanie zvierat	Krutá
Behaviorálne testovanie	Slabá
Intraperitoneálne podanie látok (jednorazové)	Slabá
Intraperitoneálne podanie látok (opakované)	Stredne krutá
Usmrtenie zvierat predávkovaním anestetikom	Bez možnosti zotavenia
Celková úroveň krutosti v postupoch	Krutá

### **Uplatňovanie zásad 3R**

Predkladaný projekt je v súlade so zásadami 3R:

#### **Zásada nahraditeľnosti:**

Nádorové ochorenia patria v celosvetovom rebríčku medzi najčastejšie príčiny úmrtia. GBM sú malígne, progresívne zhubné nádory centrálného nervového systému. Aj napriek adekvátnej chirurgickej liečbe a následnej adjuvantnej rádioterapii, chemo-rádioterapii a chemoterapii veľká časť pacientov zrecidivuje. Prognóza chorých s recidívou je pritom mimoriadne nepriaznivá s mediánom prežitia menej ako jeden rok. Cieľom predkladaného projektu je otestovať potenciálny protinádorový účinok prírodných látok v kombinácii s dnes najpoužívanejším liečivom temozolomidom. Nahradenie experimentálnych zvierat iným modelom nie je možné, nakoľko jedným z cieľom je sledovanie eliminácie vedľajších účinkov liečby temozolomidom v kombinácii s prírodnými látkami. Vzhľadom na charakter pokusu je nevyhnutné, aby bol vplyv testovaných látok analyzovaný v podmienkach *in vivo*, ktoré tvoria

systém dejov a odpovedí na stimuly z vonkajšieho a vnútorného prostredia. *In vitro* podmienky nikdy nevystihnú takú komplexnosť stimulov a dejov, ako je to v živom organizme. Z toho dôvodu nie je možné vykonať ich na nižšej úrovni biologického systému, než je celý organizmus.

#### **Zásada zníženia:**

Plánovaný postup je zostavený tak, aby k dosiahnutiu odborne relevantných a štatisticky hodnotiteľných výsledkov sme použili čo najmenší počet zvierat (10ks v experimentálnych skupinách s prenatalne indukovanou karcinogenezou a 20ks zvierat s inokulovanou bunkovou líniou) a aby bolo maximalizované množstvo výstupných informácií z každého použitého pokusného zvierat'a. Zároveň sa dbá o to, aby bola minimalizovaná bolesť alebo stres použitých pokusných zvierat a aby bol zabezpečený primeraný welfare od ich privezenia až po smrť.

#### **Zásada zdokonalenia (zjemnenia):**

Počas postupu bude zabezpečená komplexná starostlivosť o zvieratá. V chovnom zariadení ÚBEV majú experimentálne zvieratá komfortné podmienky ustajnenia, ktoré im nevyvolávajú zbytočný stres. Veľkosť a typ kliek, počet zvierat v kletke, svetelný a kŕmny režim sú nastavené optimálne pre potreby experimentálnych zvierat. Bežnú starostlivosť o zvieratá budú zabezpečovať laborantky, ktoré sú príslušne školené a poučené. Klieky sú pravidelne čistené a podstielky sú pravidelne menené zodpovedným pracovníkom, ktorý so zvieratami manipuluje šetrne. Zvieratá budú denne prehliadané a v prípade akýchkoľvek zmien (napr. zmeny na srsti, očividná malátnosť a pod.) okamžite upovedomíme zmluvného veterinárneho lekára a ďalej sa budeme riadiť jeho pokynmi. Počas priebehu experimentu budeme so zvieratami manipulovať opatrne. Zvieratá budú sledované v celom priebehu experimentu pričom ich zdravotný stav bude hodnotený na základe skóre vybraných parametrov podľa human end point. V prípade neočakávaného zhoršenia zdravotného stavu zvierat počas experimentu rozhodne vedúci projektu o usmrtení zvierat'a predávkovaním anestetikom. Tieto kroky sú zvolené tak, aby zvieratám spôsobovali minimálny stres, či poškodenie. Zvieratám sa počas pokusu nebudú podávať nijaké látky na zníženie bolesti, pretože by tieto mohli ovplyvniť sledované parametre nádorového a metabolického procesu.

#### **Human end points**

Ak pri vyhodnotení skóre nižšie uvedených parametrov zaznamenáme akékoľvek negatívne zmeny zdravotného stavu alebo správania sa zvierat, budú tieto zvieratá dôkladne sledované. V prípade, že by nedošlo k zlepšeniu stavu a vyhodnotenú skóre bude indikovať príznaky spadajúce do kategórie 3 bude experimentálny postup na danom zvierati humánne ukončený predávkovaním anestetikom.

	parameter	skóre			
		0	1	2	3
1	Príjem vody	normálny	znížený	slabý	nijaký
2	Príjem potravy	normálny	znížený	slabý	nijaký

3	Prírastok hmotnosti	normálny	-5%	-10%	-20%
4	Dýchanie	normálne	plytké	hlboké	rýchle
5	Trávenie	normálna stolica	mäkká stolica	vodnatá stolica	krv v stolici
6	Aktivita v aktívnej fáze dňa	normálna	pokles aktivity	nízka aktivita	letargia

Počas experimentu je potrebné rátať s nepriaznivou až krutou ujmov zvierat, hlavne v terminálnych štádiách experimentu. Zvieratá budú priebežne sledované zmluvným veterinárnym lekárom. V prípade, že dôjde ku manifestácii niektorého z vyššie uvedených prejavov (human end point) a vážnemu zhoršeniu zdravotného stavu jedinca, bude vyhodnotené skóre a v prípade potreby bude postup ukončený humánnym usmrtením.

Projekt bude podliehať spätnému posudzovaniu.

### Netechnické zhrnutie projektu

**Názov projektu:** Etiológia porúch skorého preimplantačného vývinu

**Číslo konania rozhodnutia o schválení projektu:** 3536/19-221/3

**Kľúčové slová v projekte (max 5 slov):** preimplantačné embryo, materská obezita, insekticídy

**Účel projektu\*:** Základný výskum

Translačný alebo aplikovaný výskum

Regulačné metódy s rutinným používaním (OECD, Výnos MH SR 2/2005 Z. z.)

Ochrana životného prostredia v záujme zdravia alebo welfare ľudí alebo zvierat

Ochrana druhov

Vysokoškolské vzdelávanie, odborné vzdelávanie

Zakladanie kolónií geneticky zmenených zvierat bez ich ďalšieho používania v postupoch

Ak je iný účel projektu, uvedie sa aký

**Opísať ciele projektu:** Hlavným zámerom 4-ročného výskumu bude odhaliť mechanizmy negatívneho vplyvu materskej intoxikácie rezíduami insekticídov a materskej obezity na vývin preimplantačného embrya. V rámci parciálnych cieľov budeme vyšetrovať využiteľnosť embryí pochádzajúcich z nefyziologického materského prostredia v biotechnologických postupoch a dopad identifikovaných porúch skorého vývinu na zdravie potomstva.

**Prínos z vykonaného projektu:** Výsledky získané v rámci projektu pomôžu definovať možné zdravotné riziká v čase oplodnenia a preimplantačného vývinu – tzn. v postpartálnom insemináčnom období u hospodárskych zvierat, v období párenia divo žijúcej zveri a spoločenských zvierat a v období prvého týždňa raného tehotenstva po prirodzenom alebo in vitro oplodnení u žien. Získané informácie by mali napomôcť pri zavádzaní preventívnych opatrení v rámci riadenia živočíšnej produkcie respektíve pri zabezpečovaní reprodukčného zdravia u ľudí s cieľom znížiť neustále narastajúci výskyt post-fertilizačnej neplodnosti.

**Druhy použitých zvierat a ich predbežné počty:** myš laboratórna, predbežný počet: 2067

**Predpokladaný nepriaznivý vplyv/ujma na použité zvieratá v rámci vykonávania projektu:**

Podstatná časť plánovaných postupov je založená na in vitro experimentoch, pri ktorých slúžia laboratórne zvieratá výhradne ako donor experimentálneho materiálu: ocytov, preimplantačných embryí a pohlavných orgánov, ktoré budú izolované až po ich usmrtení. Tým sa minimalizuje ujma zvierat – tzn. donorky materiálu nebudú intoxikované ani obézne, vplyv environmentálnych toxínov alebo mediátorov obezity bude simulovaný úpravou kultivačného mikroprostredia in vitro.

Experimenty na zvieratách zahŕňajúce materskú intoxikáciu rezíduami insekticídov alebo dietetickú indukciu obezity budú vykonané iba v odôvodnených prípadoch – tzn. keď splnenie cieľov projektu nebude možné realizovať prostredníctvom simulácie in vitro. V prípade materskej intoxikácie bude hormonálne synchronizovaným a prirodzene oplodneným samiciam myši v období preimplantačného vývinu (tzn. od 1. do 4. dňa po kopulácii so samcom) orálne podávaný thiacloprid alebo fipronil v dávke s preukázaným negatívnym účinkom na preimplantačné embryá. Keďže koncentrácie reziduí insekticídov nepresiahnu 1/100 LD50, neočakávame pozorovateľný toxický vplyv na žiadnu z ďalších orgánových sústav. V prípade materskej obezity budú samice s rôznym typom telesnej kondície

odchované v rámci štandardizovaného transgeneračného modelu, ktorý je založený na špecifickej úprave výživy budúcich donoriiek embryí počas ich vnútro maternicového a skorého postnatálneho vývinu (Ro 1261/10-221c). Keďže vysoko-energetický dietetický prídavok bude zvieratám poskytovaný ad libitum, postup nebude spojený so žiadnou ujmom alebo nepriaznivými účinkami.

**Predpokladaná úroveň krutosti:** Väčšinu postupov navrhujeme klasifikovať do kategórie krutosti „slabé“. Zvieratá by v ich dôsledku nemali pociťovať žiadnu alebo iba krátkodobú slabú bolesť, utrpenie alebo strach. V prípade hormonálnej synchronizácie pohlavného cyklu, opakovaného odberu krvi glukomerom a opakovanej orálnej aplikácie insekticídov v koncentrácii pod 1/100 LD50 navrhujeme klasifikáciu „stredná úroveň krutosti“.

### **Uplatňovanie zásad 3R**

1. Nahradenie zvierat: Väčšinu experimentov nie je možné vykonať alternatívnym spôsobom bez použitia živých zvierat. Doterajšie poznatky o problematike neumožňujú vytvorenie adekvátneho modelu in vitro alebo in silico, ktorý by dokázal simulovať zložitý vzťah medzi intoxikáciou alebo obezitou matky a ich vplyvom na reprodukčné procesy. V oboch prípadoch ide o veľmi komplexné poruchy homeostázy materského organizmu s nedostatočne preštudovanými mechanizmami. Hoci sú výstupy experimentov zamerané na prevenciu zdravia domácich zvierat a človeka, ako modelové zvieratá boli do pokusov vybrané nižšie stavovce (myši) s podobnou fyziológiou reprodukčného procesu vo vyšetrovanom (preimplantačnom) období vývinu. V prípadoch, kedy bude možné dosiahnuť čiastkové ciele projektu alternatívnymi metódami, budú experimenty vykonané na in vitro kultivovaných preimplantačných embryách alebo na in vitro kultivovaných embryonálnych kmeňových bunkách. Pri týchto postupoch budú laboratórne zvieratá slúžiť výhradne ako donor materiálu (embryí) a vplyv environmentálnych toxínov alebo mediátorov obezity je simulovaný úpravou kultivačného mikroprostredia in vitro.

2. Redukcia počtu zvierat: Plánované experimenty sú zostavené tak, aby bolo pre dosiahnutie očakávaných výsledkov použitých čo najmenej zvierat a aby bolo maximalizované množstvo výstupných informácií z každého použitého pokusného zieraťa. Žiadne ďalšie zvieratá nebudú do postupu zaradené skôr, ako bude vedeckými metódami potvrdené, že stále nebol zozbieraný dostatok biologického materiálu, ktorý poskytne interpretovateľné a štatisticky preukazné výsledky. Všetky samice zaradené do reprodukcie budú hormonálne synchronizované, čo významne zvýši pravdepodobnosť ich oplodnenia i pravdepodobnosť záchytu oocytov/embryí v žiadanej fáze vývinu a následne aj celkové počty vstupných zvierat. Pri postupoch, v ktorých budú zvieratá exponované škodlivým látkam, dosiahneme významnú redukciu vstupných myší zlučovaním experimentov, tzn. použijeme jednu skupinu kontrolných zvierat k dvom experimentálnym skupinám. V blastocystách izolovaných z intoxikovaných a neintoxikovaných samíc budeme navyše vyšetrovať iba parametre, ktoré insekticídy ovplyvnili pri testoch in vitro, čo takisto významne zníži kvantitu potrebného výskumného materiálu a prispeje k redukcii počtov donoriiek embryí.

3. Zjemnenie: Plánované experimenty sú zostavené tak, aby bola minimalizovaná bolesť alebo stres použitých pokusných zvierat a aby bol zabezpečený primeraný welfare od ich narodenia až po smrť. Zvieratá budú chované za štandardných podmienok a ich usmrtenie bude vykonávané humánnym spôsobom. Na živých zvieratách nebudeme vykonávať žiadne zákroky, ktoré by mohli spôsobiť ujmu vyžadujúcu znecitlivenie. Pri postupoch, ktoré spadajú pod určitý stupeň krutosti, znížime počet ich opakovaní na najnižšie možné minimum. Keďže v rámci postupov neplánujeme zvieratá vystavovať

vyšším stupňom diskomfortu, nie je pravdepodobné, že by počas riešenia projektu došlo k situácii, kedy by muselo byť zviera usmrtené z dôvodu, že trpí nadmernou bolesťou alebo strachom. Zvieratá budú napriek tomu intenzívne sledované (zvlášť po orálnej aplikácii roztoku s reziduami insekticídov) a bude u nich hodnotené human-end-point skóre.

Projekt bude podliehať opätovnému schvaľovaniu: áno    nie

Spätné posudzovanie 30.3.2024